

ANALOGOS DE SOMATOSTATINA MARCADOS CON ^{99m}Tc

Obenaus E. R., Crudo J. L., Edreira M. M., Castiglia S. G. de
Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Ezeiza, División
Radiofármacos

RESUMEN :

El objetivo del presente trabajo es el estudio biológico y radioquímico de dos análogos de la somatostatina, el péptido RC-160 y el Tyr³-Octreotide marcados con ^{99m}Tc por método directo e indirecto usando como quelantes MAG-3 (mercapto acetil triglicina) y HYNIC (hidroxi nicotinamida) respectivamente.

Por método directo el RC-160 fue unido al ^{99m}Tc (70% de pureza radioquímica) usando ascorbato de sodio y ditionito como reductores.

Por el método indirecto, se obtuvieron marcaciones de una pureza radioquímica mayor al 70% en el caso del RC-160 con MAG3 y de un 100% en el caso del Tyr³-Octreotide con HYNIC.

Se realizaron biodistribuciones del HYNIC-Tyr³-Octreotide en ratas Wistar normales.

INTRODUCCION :

El uso de biomoléculas marcadas, con alta especificidad para un órgano o receptor particular, es una línea de acción conveniente para obtener, por centellografía, buenas imágenes de los sitios donde se expresan los receptores específicos para la biomolécula en cuestión, minimizando por otra parte la exposición en otros órganos. Un caso particular son las células de varios tipos de tumores, que expresan una abundancia de receptores de somatostatina muy superior a la de las células normales.

La somatostatina es un péptido (14 aminoácidos) de corta vida media endógena, multifuncional, biosintetizado en hipotálamo y páncreas, actúa como neurotransmisor a nivel del SNC y como hormona, en otros sitios. Entre sus muchos efectos se destacan los inhibitorios: suprime la liberación de hormona del crecimiento por la glándula pituitaria anterior, así como la liberación de otras hormonas a nivel pituitario, pancreático y gastrointestinal; paralelamente, inhibe la proliferación de ciertas células.

Algunos tipos de tumores, generalmente los del sistema endocrino o neurológicos, pueden expresar una concentración de receptores hasta 1000 veces mayor que las células normales, es por tal motivo que esta molécula posee un alto potencial para su uso en diagnóstico (usando ^{99m}Tc o ^{111}In).

El presente trabajo se ha realizado con dos péptidos análogos sintéticos de la somatostatina nativa, el RC-160 (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂) y el Tyr³-Octreotide (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)).

Las favorables propiedades físicas, el bajo costo y la disponibilidad del ^{99m}Tc lo hacen el candidato más atractivo para el uso en radiofármacos de diagnóstico.

Los métodos de marcación con ^{99m}Tc pueden dividirse en dos grandes grupos, los métodos directos y los indirectos. En los primeros el ^{99m}Tc previamente reducido es complejado con grupos -SH endógenos obtenidos por reducción parcial de la proteína. En los métodos indirectos él ^{99m}Tc reducido previamente, se une a un quelante

exógeno, el cual está unido a la proteína (preconjugación) o se conjuga posteriormente a la marcación del quelante con ^{99m}Tc .

La ventaja principal de los métodos indirectos de marcación es su aplicabilidad a un gran espectro de biomoléculas (como anticuerpos mono y policlonales, péptidos, oligonucleótidos, etc.) y su estabilidad in vivo del compuesto marcado, en contraste a los métodos directos que poseen menor complejidad, menor estabilidad in vivo.

RESULTADOS:

Marcación de RC-160 con ^{99m}Tc por el método directo

La marcación del péptido es realizada en medio ascorbato de sodio, con el uso de ditionito y posterior calentamiento (método desarrollado por Thakur). En esta marcación juega un rol clave la concentración de ditionito que se utiliza para la reducción del péptido, dado que a mayor concentración es muy importante la formación de coloide y a menor concentración la unión del ^{99m}Tc al péptido no se realiza.

Luego de la marcación es necesaria la purificación del péptido marcado con cartuchos de Sep-Pak C-18. La fracción etanólica que contiene al péptido unido fue evaporada bajo corriente de nitrógeno y el residuo obtenido, redissuelto en 0.9% de NaCl contenido 2mg/ml de glicina

La pureza radioquímica fue analizada por HPLC usando una columna Delta Pak C-18 3.9 x 150 mm y gradiente: solvente A: metanol, solvente B: solución salina; a tiempo 0 48% de A, 52% B, a los 10 minutos 72% A, 28% B, 30 minutos 72% A, 28% B y a los 40 minutos 48% A y 52% B obteniéndose una pureza radioquímica mayor del 70%.

Marcación de RC-160 con ^{99m}Tc por el método indirecto

La conjugación del Benzoil-MAG-3 al Boc-RC-160 es llevada a cabo con el uso del HATU, el cual forma un éster activo con el MAG-3 (muy reactivo), y este reacciona con el grupo amigo de la lisina del Boc-RC-160.

Posterior a la conjugación es necesario desproteger el producto bloqueado para que el mismo tenga actividad biológica. La desprotección del conjugado bloqueado es llevada a cabo con tioanisol y TFA (ácido trifluoroacético).

Posteriormente es purificado por HPLC, recogiéndose la fracción que contiene el conjugado y marcado con ^{99m}Tc usando tártaro de estaño como transquelante. La pureza radioquímica fue evaluada por HPLC en fase reversa.

Marcación de Tyr3-Octreotide con ^{99m}Tc por el método indirecto

En este caso, al igual que para la marcación del RC-160 se usó el HATU para formar un éster activo con el Boc-HYNIC, el cual reacciona con el grupo amino de la lisina del Boc-Tyr³-Octreotide.

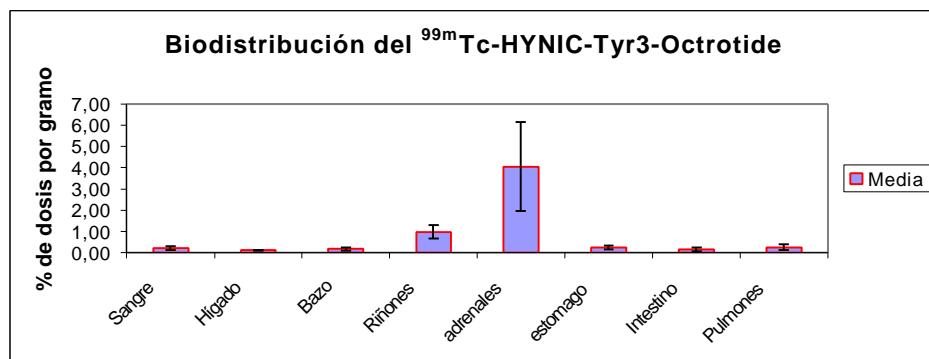
Se procedió a la desprotección del conjugado bloqueado usando tioanisol y TFA. El conjugado desbloqueado es purificado por HPLC y la fracción que lo contiene es marcado con ^{99m}Tc usando tricina como coligando.

Estudios en vivo

Se llevaron a cabo biodistribuciones en ratas Wistar normales, inyectadas con 10 μCi de $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Tyr3-Octreotide}$, por vía endovenosa en vena de cola. Los animales fueron sacrificados a las 4 horas post inyección. Con las cpm obtenidas se calcularon los porcentajes de la dosis injectada (%DI) por órgano, como la relación entre las cpm por órgano y la DI por animal, por 100.

A partir de los resultados obtenidos se realizó un gráfico de la distribución biológica del $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Tyr3-Octreotide}$ en función al %DI/gramo de tejido. En el mismo, puede observarse que existe una acumulación de actividad significativamente mayor en glándulas adrenales respecto del resto de los órganos y una actividad menor en riñones, comparada con la observada en adrenales pero nuevamente significativamente superior que para otros órganos.

Se realizaron ensayos de competencia a receptores de RC-160 marcado con ^{125}I por método directo con la técnica del Iodogen.



CONCLUSIONES:

A partir de los cromatogramas observados, los mejores resultados son los obtenidos con el HYNIC-Tyr3-Octreotide por lo tanto es el utilizado para hacer los ensayos biológicos.

En los estudios in vivo se observa una gran captación de actividad en glándulas adrenales. Esta acumulación es debida a la alta densidad de receptores para somatostatina presentes en este tejido y la actividad biológica del péptido marcado. Por otra parte, los altos niveles de actividad encontrados en riñones, serían consecuencia de la eliminación del compuesto por vía renal.

Del ensayo de competencia se obtiene el valor de la constante de disociación (K_d) del RC-160 unido al ^{125}I , dicho valor fue de 4.8×10^{-9} calculado como la concentración a B/T: 0.5.